苏云金芽胞杆菌营养期杀虫蛋白基因 *vip3A* 在枯草芽胞杆菌中的表达

邱思鑫[1], 范晓静[2], 洪鹏翔[2], 关　雄[3], 胡方平[2,*]

(1. 福建省农业科学院蔬菜研究中心 福州 350013; 2. 福建农林大学植物保护学院 福州 350002; 3. 福建农林大学生物农药与化学生物学教育部重点实验室 福州 350002)

摘要: 枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 常被用于表达杀虫和抗菌蛋白。为了探讨苏云金芽胞杆菌 *B. thuringiensis* 营养期杀虫蛋白基因(*vip3A*)在枯草芽胞杆菌中的表达情况, 促进杀虫防病工程菌构建, 将枯草芽胞杆菌 168 菌株核糖体小亚基 S4 蛋白基因的启动子与苏云金芽胞杆菌 WB7 菌株 *vip3A* 基因的编码序列连接, 插入大肠杆菌 *Escherichia coli* 与枯草芽胞杆菌穿梭载体 pAD123, 得到重组原核表达质粒 pADpvip, 将重组质粒转化枯草芽胞杆菌标准菌株 168 和分离自辣椒体内的生防内生枯草芽胞杆菌 BS-2 菌株中, 获得工程菌株。SDS-PAGE 分析表明在枯草芽胞杆菌 168 菌株的部分工程菌株中有约 88 kDa 大小的 VIP 条带, 而 BS-2 的工程菌株中未见相应的条带, 表明 Vip3A 蛋白仅在 168 菌株中表达。生物测定表明有 5 株 168 的工程菌株(168vip1-4, 6)表现较高的杀虫活性, 工程菌株发酵稀释液(约 10^7 CFU/mL)处理的小白菜叶片饲喂斜纹夜蛾 2 龄幼虫 72 h 的杀虫效果可达 87.64% ~ 92.13%, 但 *vip3A* 基因转入内生枯草芽胞杆菌 BS-2 中不表现杀虫作用。毒力测定表明 168vip2 菌株对斜纹夜蛾 2 龄幼虫 72 h 的 LC_{50} 为 0.0194 mL/mL。这些结果为进一步研究基因在枯草芽胞杆菌中的表达构建杀虫防病工程菌打下了基础。

关键词: 苏云金芽胞杆菌; 枯草芽胞杆菌; 营养期杀虫蛋白; 异源表达; 杀虫活性

中图分类号: Q965.8　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2010)05-0508-09

Expression of a vegetative insecticidal protein gene *vip3A* from *Bacillus thuringiensis* in *B. subtilis*

QIU Si-Xin[1], FAN Xiao-Jing[2], HONG Peng-Xiang[2], GUAN Xiong[3], HU Fang-Ping[2,*] (1. Vegetable Research Centre, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China; 2. College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 3. Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: *Bacillus subtilis* is commonly engineered to express insecticidal and antagonistical proteins. In order to develop a *B. subtilis* strain that expresses Vip3A protein and construct insecticidal and antagonistical strains, we fused a *vip3A* gene isolated from a *B. thuriginensis* strain WB7 to a promoter derived from the ribosomal subunit protein S4 promoter of *B. subtilis* strain 168, and then inserted this expression cassette into pAD123, an *Escherichia coi-B. subtilis* shuttle vector. An obtained plasmid (pADpvip) was then introduced into *B. subtilis* strain 168 and an antagonistic endophytic strain BS-2 which was isolated from chili pepper (*Capsicum annum* L.). Detection of vip3A expression by SDS-PAGE showed that an 88 kDa band appeared in the protein samples prepared from the pADpvip transferred cells of the strain 168, but was not shown in the samples of strain BS-2 that contained the same plasmids, indicating that the vip3A was only expressed in strain 168. Fermentation broths of engineered strains derived from strain 168 and BS-2 were subsequently tested for their insecticidal activities. Second-instar larvae of oriental leafworm (*Spodoptera litura*) were fed with Chinese cabbage leaves treated with the bacterial suspensions at a concentration of 10^7 CFU/mL. The suspension of five engineered strains (168vip1-4, 6) derived from strain 168 resulted in 87.64% - 92.13% larval mortality at 72 h after treatment, while the fermentation

基金项目: 国家"863"计划项目(2006AA10A212); 国家自然科学基金项目(30671463); 教育部博士点基金项目(20093515110010); 福建省科技厅项目(2009R10027-5)

作者简介: 邱思鑫, 男, 1974 年生, 福建宁化人, 博士, 副研究员, 研究方向为有害生物生物防治, E-mail: qiusixin@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: huf@fjau.edu.cn

收稿日期 Received: 2009-01-25; 接受日期 Accepted: 2010-03-29

broths of the transferred strain BS-2 showed no toxicity to the larvae. The results of toxicity test showed that the 72-h LC_{50} value of strain 168vip2 for the 2nd-instar larvae was 0.0194 mL/mL. These results lay the foundation for further work to improve expression of the Vip3A proteins in *B. subtilis* strains and to construct a *B. subtilis* strain that expresses both Vip3A and antagonistical proteins.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; *Bacillus subtilis*; vegetative insecticidal protein; heterologous expression; insecticide activity

苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt)是研究最深入、应用最广泛的生防微生物，随着 Bt 制剂长期广泛的使用及转基因植物大面积推广种植，害虫对其杀虫晶体蛋白的抗药性问题已突显出来。1996 年在某些 Bt 菌株中发现了在遗传和杀虫机理上与其杀虫晶体蛋白均不相同的杀虫蛋白即营养期杀虫蛋白(vegetative insecticidal proteins, VIPs)，该类蛋白对小地老虎 *Agrotis ypsilon*，甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*，棉铃虫 *Helicoverpa armigera*，草地贪夜蛾 *S. frugiperda* 和烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 等鳞翅目夜蛾科害虫具有广谱和特异的杀虫活性，是一类广谱高活性的新型杀虫蛋白(Estruch *et al.*, 1996, 2000; Selvapandiyan *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003)。由于许多夜蛾科害虫的耐药性强，是农林害虫防治中比较棘手的问题(于思勤，1998)，因此，*vip* 基因的研究和利用可为夜蛾科害虫的防治提供新的途径；另外，VIPs 与杀虫晶体蛋白的杀虫活性和作用机理不同，利用 Bt *vip* 基因构建杀虫微生物工程菌和转基因植物，对延缓害虫抗性产生及克服转基因抗虫植物的杀虫基因种类单一、杀虫谱窄等缺点具有重要意义(Singh *et al.*, 2008; Sena *et al.*, 2009)。

枯草芽胞杆菌是一种广泛存在于自然界、对人畜无毒、不污染环境、对许多植物病原生物具有拮抗作用的微生物(Emmert and Handelsman, 1999)。枯草芽胞杆菌制剂已经在黄瓜、辣椒、小麦、玉米等农作物上显示出很好的病害防治效果，目前有 4 株枯草芽胞杆菌菌株在 EPA 进行了产品登记，国内也有百抗、麦丰宁、纹曲宁等枯草芽胞杆菌制剂用于植物病害的防治。由于枯草芽胞杆菌生长快、营养简单且产生耐热、抗逆芽胞等特征，使其批量生产加工简单、成本较低、使用方便、储存期长，已成为了一种理想的生防细菌。由于生产上病虫害往往是复合发生为害，人们试图通过构建工程微生物达到对病虫兼治的目的，目前已有将 Bt *cry* 基因转入枯草芽胞杆菌的报道(Theoduloz *et al.*, 2003; 刘济宁等, 2005)，但未见将 Bt *vip* 基因转入枯草芽胞杆菌表达的研究。随着近年来夜蛾类害虫已严重影响正常的农业生产活动(江幸福等, 1999; 黄东林等 2008; 周利琳等, 2009)，且夜蛾发生的最适温度也是炭疽病等发生的适宜温度(http://icgr.caas.net.cn/disease/11-糖 烟/indexyantang.htm)，在田间我们常看到病虫同时发生，因而构建可同时防治夜蛾和植物病害的工程菌株具有重要的意义。枯草芽胞杆菌 168 菌株是模式菌株，它可合成 Bacilysocin, Subtilosin, Surfactin, TasA 和 Sublancin 168 等多种抗菌物质，其全基因组已在 GenBank 上发布(NC000964)，对其研究可为枯草芽孢杆菌的遗传表达分析提供理论指导。枯草芽胞杆菌 BS-2 是我们分离自辣椒体内，对多种病害具有良好防治作用，且可在多种植物体内定殖的菌株(颜念龙等, 2004)。本研究将 *vip3A* 基因通过大肠杆菌-枯草芽胞杆菌穿梭载体转入枯草芽胞杆菌中表达，将为构建同时具有杀虫和防病作用的菌株实现对病虫兼治的目的提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

本研究所用的菌株和质粒见表 1。

1.2 培养基、抗生素与试剂

LB 培养基：tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g , pH 值为 7.2。LA 培养基：在 LB 液体培养基中加入琼脂至终浓度为 1.5%。枯草芽胞杆菌转化培养基参照 Yasbin 等(1975)的配方略作修改。胶回收试剂盒(QIAGEN II Gel Extraction Kit)购自 QIAGEN 公司，PFU 酶和溶菌酶(lysozyme)(配成 50 mg/mL 贮藏液)购自 Promega 公司，*Taq* 酶、限制性内切酶和 T_4 连接酶均购自 TaKaRa 公司，DNA 和蛋白质分子量标准购自上海生物工程有限公司，氯霉素(使用终浓度为 5 μg/mL)和氨苄青霉素(使用终浓度为 50 μg/mL)购自 Sigma 公司；其他常规试剂参照分子克隆第 3 版(Sambrook and Russel, 2001)配制。

1.3 供试昆虫

斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*：采至田间的卵块孵化后，27 ~ 28℃的条件下人工饲养的健康幼虫。

表 1　本研究所用菌株和质粒

Table 1　Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strains and plasmids	特　性 Characteristics	来　源 Source
大肠杆菌 JM109 *Escherichia coli* JM109	*recA1*, *supE44*, *endA1*	福建农林大学植物保护学院细菌研究室 Bacterial Laboratory, College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University (FAFU)
苏云金芽胞杆菌 WB7 *Bacillus thuringiensis* WB7	*vip3A*	福建农林大学植物保护学院细菌研究室 Bacterial Laboratory, College of Plant Protection, FAFU
枯草芽胞杆菌 BS-2 *B. subtilis* BS-2	野生型 Wild type	福建农林大学植物保护学院细菌研究室 Bacterial Laboratory, College of Plant Protection, FAFU
枯草芽胞杆菌 168 *B. subtilis* 168	标准菌株 Type strain	俄亥俄州立大学芽胞杆菌保藏中心 BGSC of Ohio State University
大肠杆菌-枯草芽胞杆穿梭载体 pAD123 *B. subtilis-E. coli* shuttle vector pAD123	Cm^r, Amp^r, *gfp*	俄亥俄州立大学芽胞杆菌保藏中心 BGSC of Ohio State University
穿梭表达载体 pAD-p-vip Expression shuttle vector pAD-p-vip	Cm^r, Amp^r, *gfp*, *vip3A*	本研究 This study
工程菌 168vip Engineering strains 168vip	Cm^r, *gfp*, *vip3A*,	本研究 This study
工程菌 BS-2vip Engineering strains BS-2vip	Cm^r, *gfp*, *vip3A*	本研究 This study

1.4　引物设计及 PCR 反应

根据 168 菌株的核糖体小亚基 S4 蛋白的编码基因(*rpsD*)设计用于扩增启动子序列的引物 RpsF/RpsR，根据克隆的 *vip3A* 基因序列(EU107765)设计用于扩增 *vip3A* 基因序列的引物 vip-F/vip-R。引物序列如下：

RpsF 5′-GGAATTCGGCGGATAATTGATCTTTAG-3′, RpsR 5′-GGAATTCCTTCATATGATGAC TCCTCCTTTGG-3′, vip-F 5′-GGAATTCCATATGAACAAGAATAATACTAAATTAAGC-3′, vip-R 5′-GCTCTAGATTACTTAATAGAGACATCGTAAAAATG-3′，下划线部分为酶切位点，分别在 RpsF 上引入 *Eco*R Ⅰ，RpsR 和 vip-F 上引入 *Nde* Ⅰ，vip-R 上引入 *Xba* Ⅰ 酶切位点。

PCR 扩增仪为 Bio-Rad MyCycler，反应体系 25 μL，含 1 μL 模板 DNA(约 100 ng)、1 μL 引物(10 μmol/L)、2 μL dNTPs(每种 2.5 mmol/L)、2.5 μL 10 × PCR buffer(含 25 mmol/L $MgCl_2$)、0.3 μL pyrobest™ DNA polymerase(5 U/μL)。反应条件为 95℃预变性 4 min，95℃ 60 s，53℃ 30 s，72℃ 30 s(启动子)或 240 s(vip 和 p-vip 片段)，循环 30 次后 72℃延伸 10 min，最后冷却至 4℃。

1.5　遗传转化与基因重组

pADpvip 重组质粒构建的技术流程见图 1。PCR 参照 Dieffenbach 和 Dveksler (1995)的方法；$CaCl_2$法制备大肠杆菌感受态细胞，质粒提取、DNA 酶切、片段回收、连接及遗传转化采用常规方法(Sambrook and Russel, 2001)；芽胞杆菌总 DNA 提取参照 Xu 和 Côté(2003)的方法、芽胞杆菌质粒提取参照伍赠玲等(2004)的方法、枯草芽胞杆菌感受态细胞制备和遗传转化参照 Yasbin 等(1975)的方法进行。

1.6　工程菌株表达营养期杀虫蛋白的 SDS-PAGE 电泳

将工程菌株和对照菌株 168-pAD123 分别接种于含有 5 μg/mL 氯霉素的 LB 液体培养基中，37℃培养过夜，按 1% 接种量转接于含相应抗生素的 20 mL 新鲜 LB 液体培养基中，37℃培养至对数生长末期；BS 168 菌株除了不加抗生素外与工程菌株一样培养，分别收集各菌株培养液 12 000 r/min 离心 2 ~ 3 min，取上清液，加入硫酸铵至 100% 饱和沉淀蛋白，沉淀重悬于 0.01 mol/L 的 Tris-HCl(pH 7.0)中，装入透析袋，置 4℃ Tris-HCl 中透析，每 3 h 换一次缓冲液，至透析出的液体加入 $BaCl_2$ 无

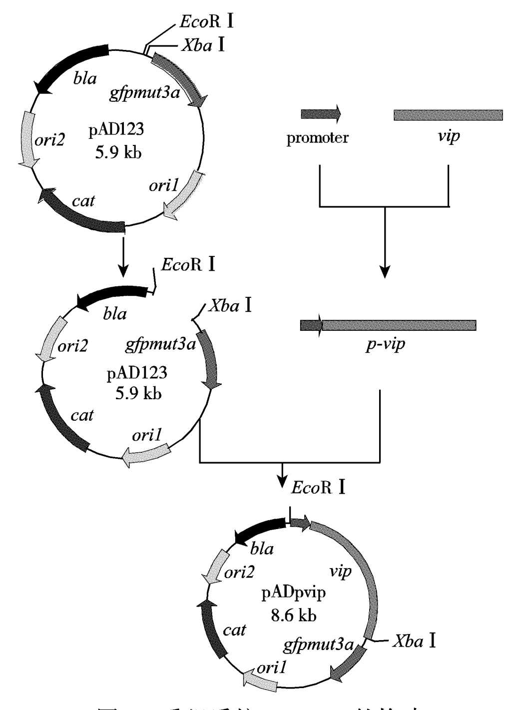


图 1　重组质粒 pADpvip 的构建

Fig. 1　Construction of recombinant plasmid pADpvip

沉淀产生，浓缩收集蛋白保存于 -20℃备用。上样前加入 2 × SDS-PAGE 电泳上样缓冲液，于 100℃沸水水浴处理 5 min，冷却，参照 Sambrook 和 Russel(2001)的方法取上清液进行凝胶电泳分析。

1. 7　工程菌株的生物测定

将各菌株在平板上活化后接种 1 环到装有 50 mL LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中(工程菌株加入氯霉素致终浓度为 5 μg/mL)。37℃培养 28 h 后，将发酵液稀释 10 倍进行生测初筛，采用半倍稀释法配制成系列浓度进行毒力测定。将 2 龄幼虫挑入直径 10 cm 的培养皿中，每皿接 30 头，上覆以保鲜膜。采用浸叶饲喂法，将小白菜叶片剪成 3 cm的圆片，置于用无菌水配制好的各浓度供试药液浸泡 10 s，取出晾干后供饥饿 24 h 的 2 龄幼虫饲食，每皿放入 6 片，用湿棉球保湿，置于培养箱［30 ± 1℃，14:10（L:D）］中饲养观察，每个处理重复 3 次，另设 LB 培养基处理的叶片作对照，感染 48 h 和 72 h 后检查结果，判断死虫标准是以毛笔轻轻触动虫体，无任何反应者为死虫，否则为活虫。当对照组死亡率大于 10% 时，为无效试验，按下式计算校正死亡率：校正死亡率(%) = 100 × (处理组死亡率 - 对照组死亡率)/(1 - 对照组死亡率)。采用 DPS 软件进行数据统计分析。

1. 8　工程菌株的生长动力学

枯草芽胞杆菌 168 菌株和工程菌株 168vip2，分别活化后在 LB 平板(后者需加入氯霉素)上划线培养，然后挑取单菌落接种到 LB 液体培养基(后者需加入氯霉素)中培养过夜。各取 5 mL 菌液离心收集菌体，并用新鲜的 LB 培养基洗涤菌体 3 次以除去抗生素和菌体代谢物，之后将菌体悬浮在 5 mL 相同的培养基中，比色测定两菌的 $A_{600\ nm}$ 值。根据洗涤过的种子液的浊度值对菌体悬浮液的体积加以调整，使两菌株悬浮液的浓度相当，再按 1% (v/v)的接种量分别接种到无抗生素的 LB 培养基中。将两菌株在完全相同的条件下培养，250 mL 三角瓶装 50 mL LB 液体培养基，于往复式恒温振荡器上培养，振荡频率 200 r/min，温度 37℃，3 个平行。每隔一定时间取样并测定菌体浊度，以光密度对数转化值 log(1 000 × $A_{600\ nm}$)为纵坐标，培养时间为横坐标作出两菌的生长曲线。

1. 9　工程菌株稳定性测定

过夜活化菌株以 1% 接种量转接于无抗生素 LB 液体培养基中，37℃，200 r/min 摇床培养 5 h，再以同样接种量转接于无抗生素 LB 培养液，于同样条件件培养，如此重复培养至 50 h。梯度稀释后涂布于无抗生素 LB 平板上，37℃培养至长出单菌落。随机选取克隆子分别点种于选择与非选择性 LB 平板上，30℃培养，单菌落长出后，观察其抗性是否丢失，然后在荧光显微镜下观察计数，鉴定工程菌在非选择性压力下的遗传稳定性。

2　结果与分析

2. 1　重组表达质粒的构建

以 RpsF/RpsR 为引物，从 Bs 168 的总 DNA 中扩增 *rpsD* 基因启动子区域，得到了 350 bp 左右与预期大小一致的片段(图 2)。利用引物 vip-F/vip-R 从 Bt WB7 总 DNA 中扩增 *vip3A* 基因的 ORF，获得大小约 2. 4 kb 与预计产物大小一致的扩增产物(图 2)。用 *Nde* Ⅰ分别酶切启动子和 *vip3A* 基因片段，回收后用 T4 连接酶连接两个片段，然后以连接产物为模板，RpsF/vipR 为引物进行 PCR 扩增获得大小约 2. 7 kb 的 p-vip 片段(图 2)，用 *Eco*RⅠ和 *Xba* Ⅰ双酶切 p-vip 片段和大肠杆菌与枯草芽胞杆菌穿梭载体 pAD123，回收后用 T4 连接酶连接并转化 JM109，采用碱裂解法提取克隆子质粒，酶切后的质粒进行琼脂糖凝胶电泳鉴定，图 3 结果表明，插入 pAD123 的片段大小与预计片段大小一致，得到

了重组原核表达质粒 pADpvip（重组质粒的构建流程见图 1）。为了避免因 PCR 扩增时发生的碱基错配影响 vip3A 基因的表达，共挑取 6 个克隆子提取重组表达质粒进行之后的芽胞杆菌转化与表达分析。

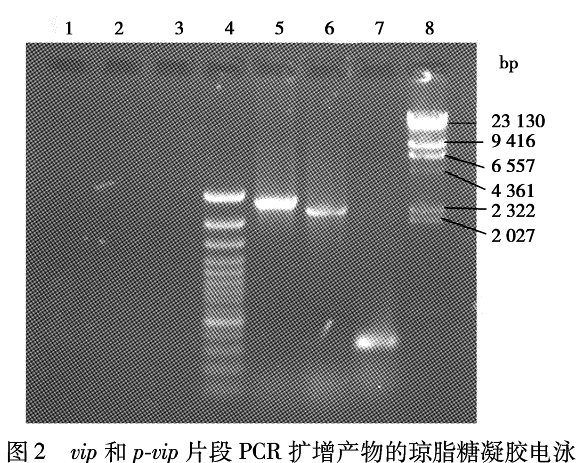


图 2 *vip* 和 *p-vip* 片段 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR amplified products of *vip* and *p-vip*

1 – 3：阴性对照 Negative control；4：DNA 分子量标准物 Gene Ruler™100 bp DNA Ladder Plus；5：启动子-营养期杀虫蛋白基因 *p-vip*；6：营养期杀虫蛋白基因 *vip*；7：启动子 Promoter；8：DNA 分子量标准物 λDNA/*Hin*d Ⅲ marker.

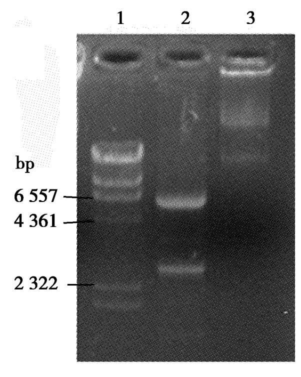


图 3 重组质粒 pADpvip 的限制性酶切鉴定

Fig. 3 Restriction enzyme analysis of recombinant plasmid pADpvip

1：DNA 分子量标准物 λDNA/*Hin*d Ⅲ marker；2：重组质粒的 *Eco*R Ⅰ/*Xba* Ⅰ 双酶切 pADpvip digested with *Eco*R Ⅰ and *Xba* Ⅰ；3：重组质粒 pADpvip.

2.2 工程菌的构建

将获得的重组质粒采用枯草芽胞杆菌普通转化方法转化 168 菌株和 BS-2 菌株，然后涂布于含氯霉素的平板上筛选转化子，37℃培养，挑取转化子用 vip-F/vip-R 引物进行菌落 PCR，从图 4 中可知转化子中可以扩增出明亮的 *vip3A* 基因片段条带，表明 *vip3A* 基因转已成功转化到枯草芽胞杆菌 168 和 BS-2 菌株中。

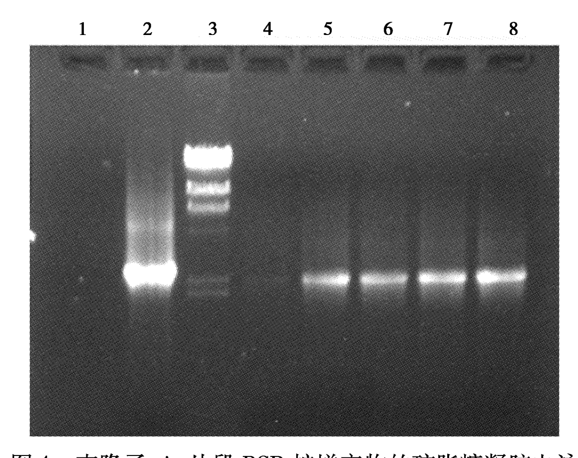


图 4 克隆子 vip 片段 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of PCR amplified products of vip from clones

1：阴性对照 Negative control；2：阳性对照 Positive control；3：DNA 分子量标准物 λDNA/*Hin*d Ⅲ marker；4 – 6：BS-2 菌株的转化子 Transformants of BS-2 strain；7 – 8：168 菌株的转化子 Transformants of 168 strain.

2.3 VIP 蛋白 SDS-PAGE 电泳分析

工程菌株 168vip1，168vip3，168vip5，168pAD123 和标准菌株 168 培养上清液中的蛋白 SDS-PAGE 电泳结果表明，工程菌 168vip1，168vip3 在 88 kDa 左右均有蛋白条带，与 VIP 蛋白理论分子质量相近，而工程菌 168vip5 和只转入不含 *vip* 基因穿梭载体的 168pAD123 菌株与标准菌株 168 的上清蛋白上没有相应的条带，表明苏云金芽胞杆菌营养期杀虫蛋白转化枯草芽胞杆菌 168 菌株后在部分克隆子中得到了表达；另外，*vip3A* 基因转化 BS-2 菌株后得到 BS-2vip1 和 BS-2vip3 工程菌株没有 VIP 蛋白条带，表明苏云金芽胞杆菌营养期杀虫蛋白在野生型枯草芽胞杆菌 BS-2 菌株中没有得到正常表达（图 5）。

2.4 工程菌的杀虫活性筛选

分别挑取 *vip3A* 基因表达载体转化枯草芽胞杆菌 168 菌株和 BS-2 菌株的 PCR 阳性克隆子进行杀虫活性筛选，从表 2 中可知 *vip3A* 基因转化枯草芽胞杆菌 168 菌株的 6 个 PCR 阳性克隆子中仅有 1 个菌株不表现杀虫活性，其余有 5 个菌株均表现出较好杀虫作用，且各菌株之间差异不显著，处理后 72 h 对斜纹夜蛾 2 龄幼虫有 87.64% ~92.13% 的杀虫效果，这可能是由于 *vip3A* 基因 PCR 扩增时发生了碱基错配使 168vip5 无法正常表达 VIP 蛋白。

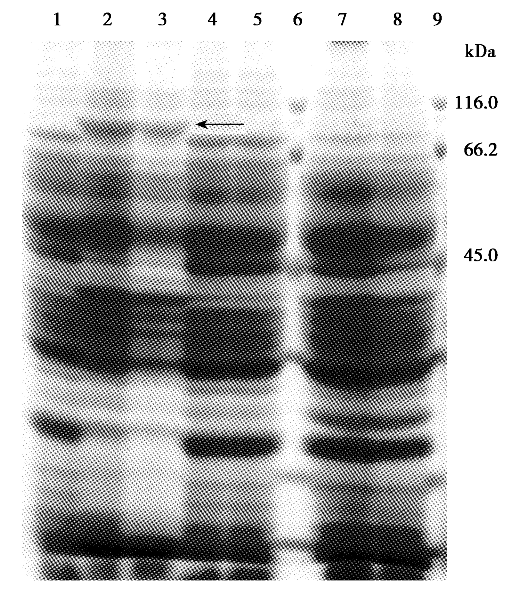


图 5　VIP 蛋白在 168 菌株中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5　SDS-PAGE analysis of the VIP produced in *Bacillus subtilis* strain 168

1：168；2：168-vip1；3：168-vip3；4：168-vip5；5：168pAd123；6，9：蛋白质分子量标准物 Protein molecular weight Marker；7，8：BS-2-vip.

而 *vip3A* 基因转化 BS-2 菌株的 6 个阳性克隆子均不表现杀虫效果，是由于 pAD123 质粒无法满足 *vip3A* 基因在野生枯草芽胞杆菌 BS-2 菌株中表达，还是 BS-2 菌株使 VIP 蛋白无法正常发挥功能有待于进一步研究。

2.5　工程菌的毒力测定

以 168vip2 菌株为研究对象进一步测定工程菌株发酵液对斜纹夜蛾 2 龄幼虫的致死中浓度，测定结果表明，工程菌杀虫速效性较差，不论是高浓度还是低浓度菌液 24 h 内均无明显的杀虫效果，处理 48 h 后高浓度表现出较好的杀虫效果，随着浓度的降低杀虫效果显著下降。工程菌发酵液饲喂斜纹夜蛾 2 龄幼虫 48 h 和 72 h 的毒力回归方程见表 3，2 条毒力回归曲线的卡方测验 *P* 值均大于 0.05，表明所得毒力回归曲线合适，48 h 和 72 h 的致死中浓度分别是 0.0390 和 0.0194 mL/mL。

2.6　生长动力学曲线的测定

BS 168 和工程菌株 168vip2 在 LB 液体培养基中的生长动力学曲线如图 6 所示。这两个菌株在生

表 2　工程菌对斜纹夜蛾 2 龄幼虫的杀虫效果

Table 2　Insecticidal effect of engineering strains to the 2nd instar larvae of *Spodoptera litura*

处理 Treatment	供试虫数 Number of larvae tested	48 h 死亡率(%) Mortality	48 h 校正死亡率(%) Corrected mortality	72 h 死亡率(%) Mortality	72 h 校正死亡率(%) Corrected mortality
168vip1	90	76.67 ± 1.92	76.67 ± 1.92 bc	90.00 ± 3.33	89.89 ± 3.37 a
168vip2	90	84.44 ± 2.94	84.44 ± 2.94 a	92.22 ± 2.94	92.13 ± 2.97 a
168vip3	90	70.00 ± 3.33	70.00 ± 3.33 c	88.89 ± 2.22	88.76 ± 2.25 a
168vip4	90	80.00 ± 3.85	80.00 ± 3.85 ab	87.78 ± 4.84	87.64 ± 4.90 a
168vip5	90	2.22 ± 1.11	2.22 ± 1.11 d	2.22 ± 1.11	1.12 ± 1.12 b
168vip6	90	77.78 ± 4.84	77.78 ± 4.84 b	91.11 ± 2.22	91.01 ± 2.25 a
168pAd123	90	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00	−1.12 ± 0.00 b
168	90	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 d	1.11 ± 1.11	0.00 ± 1.12 b
BS2vip1	90	1.11 ± 1.11	1.11 ± 1.11 d	3.33 ± 1.92	2.25 ± 1.95 b
BS2vip2	90	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00	−1.12 ± 0.00 b
BS2vip3	90	1.11 ± 1.11	1.11 ± 1.11 d	1.11 ± 1.11	0.00 ± 1.12 b
BS2vip4	90	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 d	1.11 ± 1.11	0.00 ± 1.12 b
BS2vip5	90	2.22 ± 1.11	2.22 ± 1.11 d	2.22 ± 1.11	1.12 ± 1.12 b
BS2vip6	90	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00	−1.12 ± 0.00 b
BS2pAD123	90	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 d	1.11 ± 1.11	0.00 ± 1.12 b
BS-2	90	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00	−1.12 ± 0.00 b
CK	90	0.00 ± 0.00		1.11 ± 1.11	

表中数据为均值 ± 标准误，同栏的相同字母表示新复极差测验不显著（*P* > 0.05，Duncan 氏检验）。Data are means ± *SE*. Values followed by the same letters within a column are not significantly different (*P* > 0.05; Duncan's test).

表 3 工程菌 168vip2 对斜纹夜蛾 2 龄幼虫的 LC_{50}

Table 3 The LC_{50} of engineering strain 168vip2 to the 2nd instar larvae of *Spodoptera litura*

时间(h) Time	相关系数 Relationship coefficient	回归方程式 Toxic regression formula	卡方测验 *P* 值 *P* value of χ^2 test	LC_{50} value (mL/mL)	95% 置信区间 95% Confidence limits
48	0.9960	$y = 6.6928 + 1.2016x$	0.9034	0.0390	0.0294 - 0.0510
72	0.9974	$y = 6.9680 + 1.1498x$	0.9343	0.0194	0.0127 - 0.0265

长过程中，生长曲线的变化趋势大致相同。从菌体生长的对数曲线上可以看出，在上述的接种培养条件下，BS 168 菌株在接种后 60 min 时进入指数生长期，4 h 后指数生长期结束，而 168vip2 80 min 时进入指数生长期，指数生长期结束于 5 h，比野生菌滞后了 1 h 左右。根据生长曲线，BS 168 和工程菌株 168vip2 在 LB 培养基中生长时，其代时分别为 0.60 h 和 0.74 h，标记菌株代时延长 23.3%，说明外源基因转入后的菌株生长滞后、生长速度变慢。

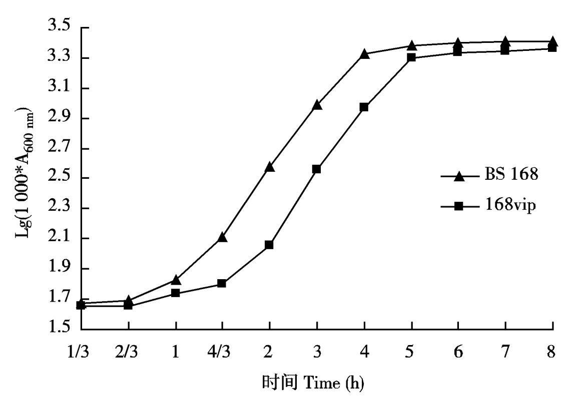


图 6 BS 168 和 168vip2 菌株的生长曲线

Fig. 6 Growth curve of *Bacillus subtilis* 168 and 168vip2

2.7 质粒遗传稳定性测定

携带重组质粒 pADpvip 的菌株 168vip2 在无抗性 LB 液体培养基中培养 50 h 后，稀释涂于 LB 非选择性平板上，培养至长出单菌落，随机挑取 300 个单菌落分别在选择性和非选择性培养基上作影印对比点种试验，结果表明氯霉素抗性标记的保持率为 88%。由于 pAD123 质粒上带有一个不含启动子的 *gfp* 基因阅读框，在质粒 pADpvip 中启动子和 *vip* 基因序列插入了 *gfp* 基因的上游，*gfp* 基因和 *vip* 基因是共转录的，所以在工程菌中表达 *vip* 基因的同时 *gfp* 基因也得到表达。通过荧光显微镜观察表明氯霉素抗性标记保持的菌株在蓝光下都能发出绿色荧光，不抗氯霉素的菌株均不产生绿色荧光，表明氯霉素抗性标记菌株都携带有启动子-*vip*-*gfp* 组件。如果以代时 0.74 h 计算，则每代的质粒保持率约为 99.8%，表明质粒在受体菌中基本可以稳定遗传。

3 讨论

芽胞杆菌是重要的农业微生物，广泛存在于土壤、植物根际和叶围及植物体内，许多天然分离菌株能够促进植物生长且可产生多种抗菌物质，是植物有害生物生防菌株的重要来源，许多具有优良性状的菌株已成功应用于植物病虫害的生物防治，目前应用的种类主要有苏云金芽胞杆菌、枯草芽胞杆菌、腊质芽胞杆菌、地衣芽胞杆菌等。枯草芽胞杆菌对人畜安全，是一种在植物生产、畜群养殖、生态环保以及工业和医药等领域均有良好应用前景的芽胞杆菌。通过现代生物技术提高生防枯草芽胞杆菌菌株的拮抗性能、扩大其防治对象，已成为研究热点。本研究将苏云金杆菌营养期杀虫蛋白基因转入枯草芽胞杆菌 168 菌株，实现了 *vip* 基因在枯草芽胞杆菌标准菌株中的高效表达，为构建工程菌将枯草芽胞杆菌与其他微生物的优良特性整合在一起提供了基础。

由于枯草芽胞杆菌野生菌株中影响外源基因表达的因素较多，不同菌株也存在一定的差异，往往会因各种因素而造成外源基因表达受阻。在枯草芽胞杆菌中表达外源蛋白主要的影响因素之一是其蛋白酶的水解作用。枯草芽胞杆菌的胞外分泌功能非常发达，从标准菌株整个基因组估算大约可合成 4107 种蛋白，按电脑预测其中有 25% 的蛋白是可输出胞外的(Tjalsma *et al*., 2000)。大多数情况下枯草芽胞杆菌分泌的是酶，其中有多种蛋白水解酶，这些酶会降解外源蛋白(Simonen and Palva, 1993)。而且不仅仅胞外分泌蛋白使外源蛋白表达产物降解，细胞膜和细胞壁上的分泌蛋白质量控制系统也会降解外源蛋白(Tjalsma *et al*., 2000)，因此在野生型枯草芽胞杆菌内表达外源蛋白相当困难，为了提高外源蛋白的表达一系列蛋白酶基因的突变体相继被构建(Wong, 1995)，但对于植物病

害生物防治菌株，在蛋白酶基因突变后是否会影响其生防效果尚没有相关研究。本研究将 *vip* 基因转入具有良好防病效果的 BS-2 菌株后在 SDS-PAGE 中没检测到相应的蛋白条带，工程菌杀虫效果检测也不表现活性，是没有表达还是表达后被降解或是其他原因还有待进一步研究。

用 PCR 扩增基因进行表达研究时往往会发生碱基错配导致基因无法正常表达。本研究选择枯草芽胞杆菌核糖体蛋白的启动子进行高效杀虫蛋白的表达，根据 DNA 序列分别设计启动子和 *vip* 基因 ORF 序列扩增的特异引物，通过 *Nde* Ⅰ 酶切位点将启动子和 *vip* 基因的 ORF 连接，构建了苏云金芽胞杆菌营养期杀虫蛋白基因表达盒。为了避免 PCR 引起的错配，首先采用 *Taq* plus DNA 高保真聚合酶进行 DNA 扩增；其次，提取了多个克隆子的重组质粒转化枯草芽胞杆菌，通过杀虫效果和 SDS-PAGE 筛选表达 VIP 蛋白的工程菌株；最后，选择一个筛选出来的重组质粒进行测序，证实了启动子与 *vip* 基因连接及序列的正确性。实验中 *vip* 基因转入枯草芽胞杆菌标准菌株 168 后，个别 PCR 阳性菌株不表达相应的杀虫蛋白，这可能是由于 DNA 聚合酶延伸时发生了错配或是 DNA 操作过程中紫外照射引发了碱基突变，使得基因无法正常表达，因此在进行基因表达研究时必须采取多种措施保证基因正常表达。

野生型枯草芽胞杆菌由于其遗传修饰系统比较复杂，造成其遗传转化效率很低甚至不能转化（Westers *et al*., 2003）。本研究构建了重组穿梭表达质粒，能有效转化模式菌株 168 并表现良好的杀虫效果，但转化效率很低（约 $1\times10^2\sim3\times10^2$ cfu/g DNA），而对自然分离的枯草芽胞杆菌 BS-2 菌株，其转化率更低，也反映了野生型菌株基因操作的复杂性。如何对其遗传修饰系统进行改造提高转化率和工程菌稳定性，也是构建高效表达工程菌所需探讨的问题。

苏云金芽胞杆菌制剂具有无残留污染、对靶标害虫高度专一性和对非靶标生物安全的优点，被广泛应用于农林害虫的生物防治，产生了巨大的社会和经济效益。将其编码杀虫蛋白的基因导入生防枯草芽胞杆菌中，构建病虫兼治的基因工程菌具有广阔的应用前景。人们也试图构建出病虫兼治的优良工程菌，Theoduloz 等（2003）曾将苏云金芽胞杆菌 *cry1Ab* 基因转入枯草芽胞杆菌得到表达；刘济宁等（2005）在枯草芽胞杆菌中成功表达 *cry1Ac* 基因；颜念龙等（2004）也将苏云金芽胞杆菌与枯草芽胞杆菌 BS-2 菌株通过原生质体融合得到含有 *vip3A* 基因和杀小菜蛾活性融合子，但没有明确 *vip3A* 基因的表达情况。为了进一步明确 *vip3A* 基因在枯草芽胞杆菌中表达，本研究采用基因操作的方法将 Bt *vip3A* 基因转入不同枯草芽胞杆菌菌株中，但 VIP 蛋白仅在标准菌株中得到表达，而在具有良好防病功能的野生型菌株 BS-2 中没有得到表达。为了得到 VIP 蛋白高效表达的病虫兼治工程菌，今后可开展以下几项工作：明确野生菌株 BS-2 的遗传修饰情况并对其进行相应的改造；将 *vip* 基因转入其他具有高效防病作用的菌株中；将 *vip* 基因整合到枯草芽胞杆菌的染色体上与其本身的蛋白进行融合表达。

参 考 文 献（References）

Dieffenbach CW, Dveksler GS, 1995. PCR Primer: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Emmert EAB, Handelsman J, 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol. Lett.*, 171: 1 – 9.

Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, Nye GJ, Craig JA, Koziel MG, 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 5 389 – 5 394.

Estruch JJ, Yu CG, Warren GW, Desai NM, Koziel MG, Nye GJ, 2000. Class of proteins for the control of plant pests. United States Patent, 6 107 279.

Huang DL, Xia JY, Liu H, Wang W, Ji ZW, Wang Q, 2008. Effects of three leafy turfgrasses on the development and nutrition utilization of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomol. Sin.*, 51(2): 155 – 160. [黄东林，夏锦瑜，柳慧，王伟，季正文，王倩，2008. 三种阔叶草坪草对斜纹夜蛾生长发育及营养利用的作用. 昆虫学报，51(2): 155 – 160]

Jiang XF, Luo LZ, Hu Y, 1999. Influence of larval diets on development, fecundity and flight capacity of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Acta Entomol. Sin.*, 42(3): 270 – 276. [江幸福，罗礼智，胡毅，1999. 幼虫食物对甜菜夜蛾生长发育、繁殖及飞行的影响. 昆虫学报，42(3): 270 – 276]

Lee MK, Walters FS, Hart H, Palekar N, Chen JS, 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of CrylAb δ-endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 4 648 – 4 657.

Liu JN, Liu XJ, Yu XY, Peng ZQ, 2005. Construction of recombined plasmid carrying *cry1Ac* gene and expression of insecticidal activities in *Bacillus subtilis*. *Acta Entomol. Sin.*, 48(3): 342 – 346. [刘济宁，刘贤进，余向阳，彭正强，2005. Cry1Ac 基因载体构建及其在枯草芽孢杆菌中的杀虫活性表达. 昆虫学报，48(3): 342 – 346]

Sambrook J, Russell DW, 2001. Molecular Cloning: A Laboratory

Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Selvapandiyan A, Arora N, Rajagopal R, Jalali SK, Venkatesan T, Singh SP, Bhatnagar RK, 2001. Toxicity analysis of N- and C-terminus deleted vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 5 855 – 5 858.

Sena JAD, Hernández-Rodríguez CS, Ferré J, 2009. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(7): 2 236 – 2 237.

Simonen M, Palva I, 1993. Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol. Rev.*, 57(1): 109 – 137.

Singh CK, Ojha A, Bhatanagar RK, Kachru DN, 2008. Detection and characterization of recombinant DNA expressing *vip3A*-type insecticidal gene in GMOs-standard single, multiplex and construct-specific PCR assays. *Anal. Bioanal. Chem.*, 390: 377 – 387.

Theoduloz C, Vega A, Salazar M, González E, Meza-Basso L, 2003. Expression of a *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin *cry1Ab* gene in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* strains that naturally colonize the phylloplane of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*, Mills). *J. Appl. Microbiol.*, 94: 375 – 381.

Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JDH, Bron S, van Dijl JM, 2000. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64(3): 515 – 547.

Westers H, Dorenbos R, van Dijl JM, Kabel J, Flanagan T, Devine KM, Jude F, Séror SJ, Beekman AC, Darmon E, Eschevins C, de Jong A, Bron S, Kuipers OP, Albertini AM, Antelmann H, Hecker M, Zamboni N, Sauer U, Bruand C, Ehrlich DS, Alonso JC, Salas M, Quax WJ, 2003. Genome engineering reveals large dispensable regions in *Bacillus subtilis*. *Mol. Biol. Evol.*, 20(12): 2 076 – 2 090.

Wong SL, 1995. Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 6: 517 – 522.

Wu ZL, Huang TP, Qiu JZ, Li XB, Guan X, 2004. An improved method for the isolation of plasmid DNA of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 33(2): 200 – 201. [伍赠玲, 黄天培, 邱君志, 李训波, 关雄, 2004. 一种改良的苏云金芽孢杆菌质粒 DNA 提取方法. 福建农林大学学报(自然科学版), 33(2): 200 – 201]

Xu D, Côté JC, 2003. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3′ end 16S rDNA and 5′ end 16S-23S ITS nucleotide sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53: 695 – 704.

Yan NL, Qiu SX, He H, Guan X, Hu FP, 2004. Construction of antagonistical, insecticidal, and endophytic multifunctional-engineering strains by protoplast fusion. *J. Agric. Biotechnol.*, 12(6): 704 – 708. [颜念龙, 邱思鑫, 何红, 关雄, 胡方平, 2004. 原生质体融合构建防病、杀虫和内生多功能工程菌. 农业生物技术学报, 12(6): 704 – 708.

Yasbin RE, Wilson GA, Young FE, 1975. Transformation and transfection in lysogenic strains of *Bacillus subtilis*: Evidence for selective induction of prophage in competent cells. *J. Bacteriol.*, 121: 296 – 304.

Yu SQ, 1998. A preliminary study on fauna of Noctuidae (Lepidoptera: Ditrysia) insects in China. *Entomotaxonomia*, 20(1): 44 – 50. [于思勤, 1998. 中国夜蛾科昆虫区系初步研究(鳞翅目: 双孔亚目). 昆虫分类学报, 20(1): 44 – 50]

Zhou LL, Si SY, Wang ZX, Wang Y, Liu XM, 2009. Biochemical mechanisms of beet armyworm (*Spodoptera exigua*) resistance to tebufenozide. *Acta Entomol. Sin.*, 52(4): 386 – 394. [周利琳, 司升云, 汪钟信, 望勇, 刘小明, 2009. 甜菜夜蛾对虫酰肼抗性的生化机制. 昆虫学报, 52(4): 386 – 394]

(责任编辑: 赵利辉)